Tab. 4.9: Semiquantitative Analyse cytologischer Veränderungen in isolierten Hepatocyten nach Belastung mit wäßrigem Eluat aus Sediment von Krähenbach und Körsch (Probennahme Juli 1997).

	1d					2d				
	Ko	Krä 1:4	Krä 1:3	Kö 1:4	Kö 1:3	Ko	Krä 1:4	Krä 1:3	Kö 1:4	Kö 1:3
Veränderte Zellform	±	±	±	+	+	±	±	±	+	++
Kompartimentierung	+++	+++	++	++	+	+++	++	+	+	±
Kern										
Veränderte Kernform	±	±	±	±	+	±	±	+	+	+
Dilatierte Kernhülle	±	±	+	+	+	±	±	+	+	+
Heterochromatinzunahme	±	±	+	++	+++	±	+	++	+++	++++
Marginalisierung	±	±	+	++	+++	±	+	++	+++	++++
Kerneinschlüsse	±	±	±	±	+	±	±	±	+	++
Lageveränderung	±	±	±	±	+	±	±	±	+	++
Nucleoli in Mehrzahl	±	±	±	±	+	±	±	±	+	+
Mitochondrien										
Erhöhte Heterogenität	±	±	+	+	++	±	±	+	++	++
Auflösung der Cristae	±	+	++	++	+++	±	++	+++	+++	+++
Myelinakkumulation	±	±	±	±	+	±	±	±	±	+
Assoziation mit ER-Zistern	+	++	++	++	+	+	++	+	+	+
Assoziation mit Peroxisomen	+	+	+	+	++	+	+	+	+	++
RER										
Menge	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	++	++
Stapelbildung	+++	+++	++	++	+	+++	++	++	+	±
Dilatation	±	±	+	+	+	±	±	+	+	+
Vesikulierung	+	+	++	++	+++	+	++	++	+++	++++
RER-Wirbel	±	±	±	±	+	±	±	±	±	+
SER										
Menge	+	+	+	++	++	+	+	++	++	+++
Golgi-Felder										
Dilatation	±	±	+	+	++	±	±	+	++	+++
Myelin in Golgi-Zisternen	±	±	±	±	±	±	±	±	±	+
Aktivität	+++	+++	++	++	++	+++	+++	++	++	+
Lysosomen										
Primäre Lysosomen	+	+	++	++	+++	++	++	++	++	++
Sek. und tert. Lysosomen	±	±	+	+	+++	±	±	++	++	++++
Myelinkörper	±	±	+	+	++	±	+	+	++	+++
Vakuolen	±	±	±	+	+	±	±	+	++	++
Peroxisomen										
Menge	+	+	++	++	+++	+	++	++	+++	+++
Akkumulationen	±	±	++	++	+++	±	+	++	++	+++
Lipid										
Menge	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
Glykogen										
Menge	+	+	±	±	±	+	+	±	±	±

Zeichenerklärungen: ± = fehlend; + = schwach; ++ = vorhanden; +++ = stark; ++++ = sehr stark; Krä = Krähenbach, Kö = Körsch; n = 50 Zellen.

einer Abnahme von RER-Stapeln (Abb. 4.50) sowie einer Zunahme von Myelinkörpern und Peroxisomen (Abb. 4.52).

Krähenbach wäßriges Eluat 1:3

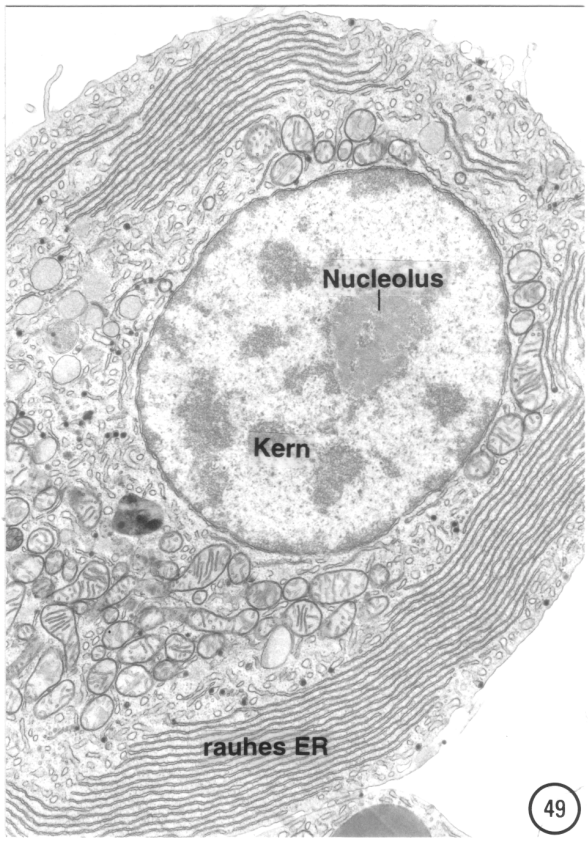
Beim wäßrigen Eluat aus Krähenbachsediment (1:3) konnte man nach 1 d Belastung der isolierten Hepatocyten die bereits geschilderten Veränderungen stärker und früher beobachten. Zudem besaßen einige Zellkerne erweiterte Kernhüllen, die Mitochondrien waren heterogen in Größe und Gestalt und es traten Dictyosomen mit dilatierten Zisternen und abnehmender Aktivität auf. Weiterhin konnte man im Cytoplasma primäre, sekundäre und tertiäre Lysosomen (Abb. 4.50, 4.52, Tab. 4.9) sowie eine Abnahme der Glykogenspeicher feststellen (Abb. 4.49, 4.50, 4.51).
Nach einer Belastungsdauer von 2 d kamen weitere Effekte hinzu wie eine veränderte Kernform, eine abnehmende Assoziation von Mitochondrien mit RER-Zisternen, ein Rückgang des RER-Gehaltes, eine Zunahme des SER-Gehaltes, eine enge Assoziation von RER-Zisternen und Peroxisomen (Abb. 4.51) und eine erhöhte Anzahl an Vakuolen sowie Lipidtropfen im Cytoplasma.

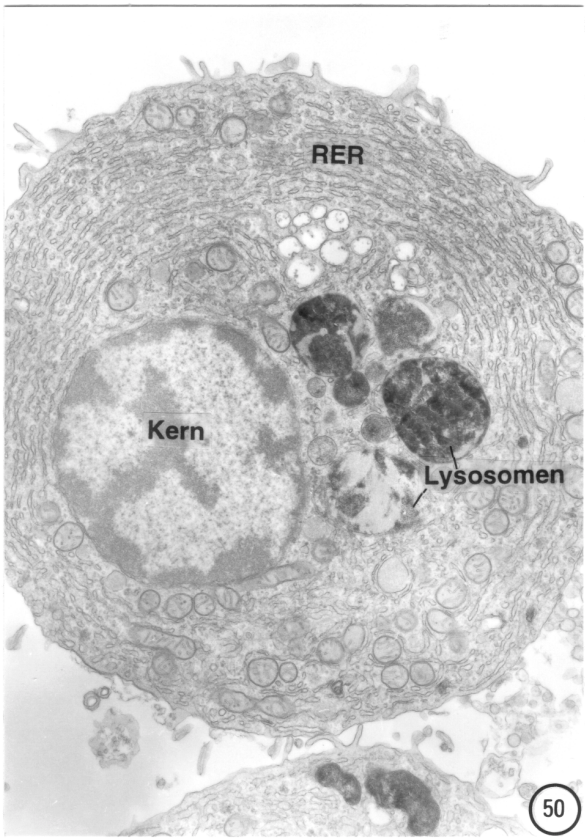
Körsch wäßriges Eluat 1:4

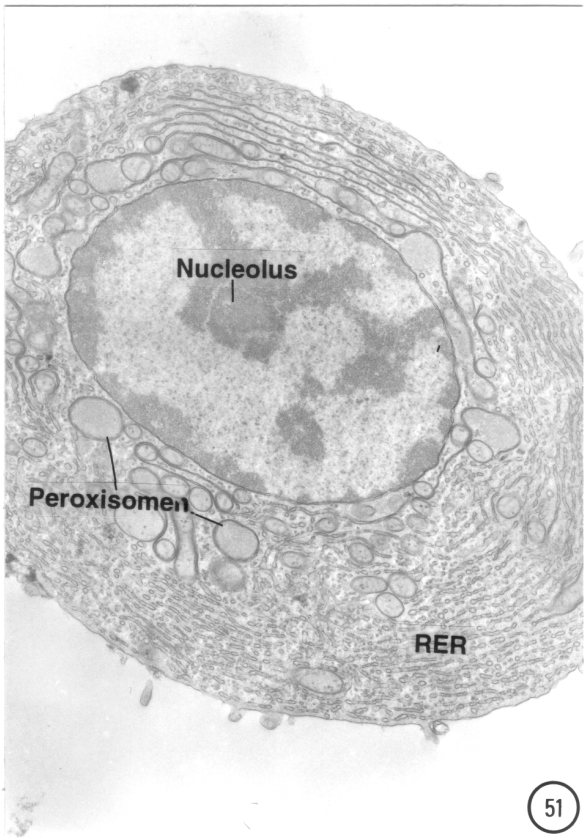
In den mit Körsch Sediment Eluat belasteten Zellen traten bereits nach einem Tag veränderte Zellformen auf (Abb. 4.55). Neben einer gestörten cytoplasmatischen Kompartimentierung (Abb. 4.53, Tab. 4.9), dilatierten Kernhüllen (Abb. 4.54), auffälliger Heterochromatinzunahme und Marginalisierung (Abb. 4.54, Pfeilköpfe) besaßen die Mitochondrien eine heterogene Form und Gestalt mit aufgelösten Cristae und bildeten enge Assoziationen zu RER-Zisternen und Peroxisomen (Abb. 4.53). Die Zisternen des RER bildeten nur selten Stapel aus und waren vesikuliert (Abb. 4.54, 4.59). Weiterhin nahm der Gehalt an SER zu (Abb. 4.56), während der Golgi-Apparat desorganisiert war (Abb. 4.58, Tab. 4.9), die Zisternen der Dictyosomen dilatiert waren und einen Aktivitätsrückgang aufwiesen. Im Cytoplasmakonnte man vermehrt Lysosomen (Abb. 4.61, 4.62), Myelinkörper, Vakuolen (Abb. 4.57), Peroxisomen als auch Peroxisomencluster beobachten. Zudem kam es zu einer verstärkten Entleerung der Glykogenspeicher.
Die beschriebenen Effekte konnten nach 2 d in den belasteten Zellen häufiger und deutlicher beobachtet werden. Neu hinzugekommene Veränderungen waren Zellkerne mit unregelmäßiger Kernform (Abb. 4.61), einzelne Kerneinschlüsse (Abb. 4.60, Pfeilköpfe), eine Lageveränderung von Zellkernen in die Peripherie (Abb. 4.61), eine Vermehrung von Nucleoli, eine verminderte Assoziation von Mitochondrien mit RER-Zisternen, Abnahme des RER-Gehaltes (Abb. 4.62), das Auftreten von elektronendichten Strukturen in RER-Zisternen und Anstieg des SER-Gehaltes (Abb. 4.56).

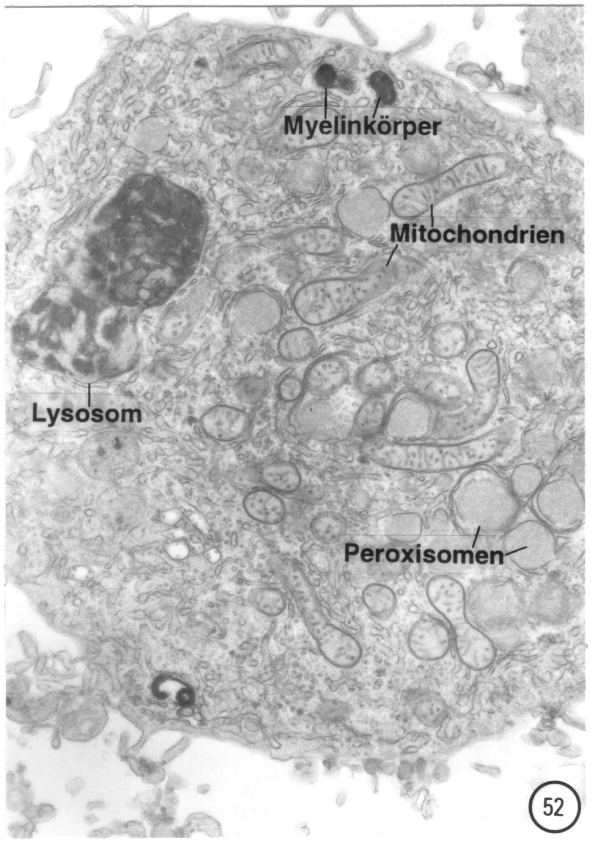
Körsch wäßriges Eluat 1:3

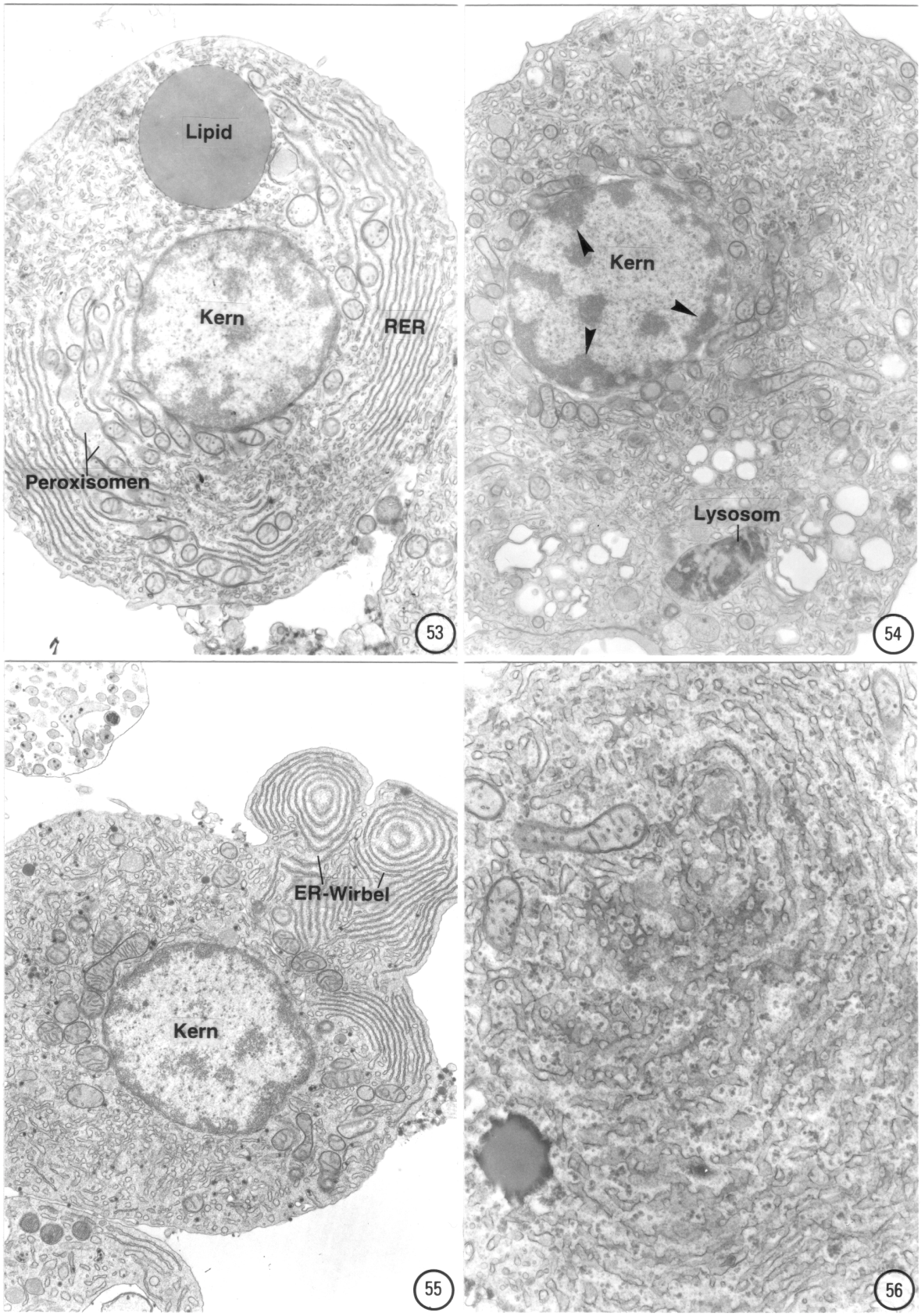
Bei Exposition mit wäßrigem Eluat (1:3) aus der Körsch traten die bereits bei der 1:4-Verdünnung geschilderten Veränderungen früher und stärker auf. Nach 1 d Belastung waren die isolierten Hepatocyten geprägt durch eine sehr starke Zunahme und Marginalisierung von Heterochromatin (Abb. 4.60, 4.61), weitgehend aufgelösten mitochondrialen Cristae (Abb. 4.59), einer auffälligen Vesikulierung des RER (Abb. 4.59, 4.61), der Ausbildung von RER-Wirbeln (Abb. 4.55), dem Auftreten myelinartiger Strukturen in Zisternen des Golgi-Apparates (Abb. 4.62), einer enormen Zunahme an Lysosomen, Vakuolen (Abb. 4.57), Peroxisomen, Peroxisomencluster und Lipidtropfen (Abb. 4.61).
Die degenerativen Effekte in den belasteten Hepatocyten nahmen nach 2 d weiter zu.

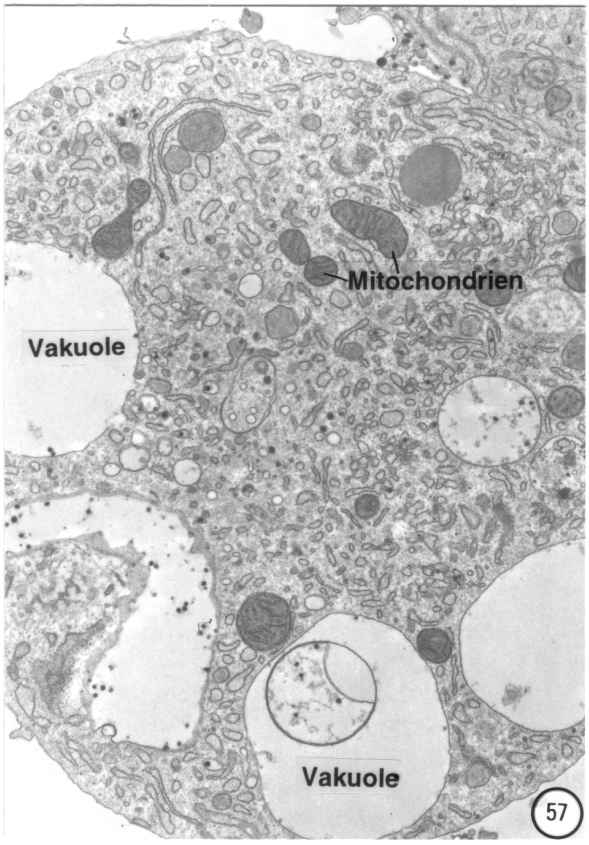

Nucleolus
Kern
rauhes ER
49

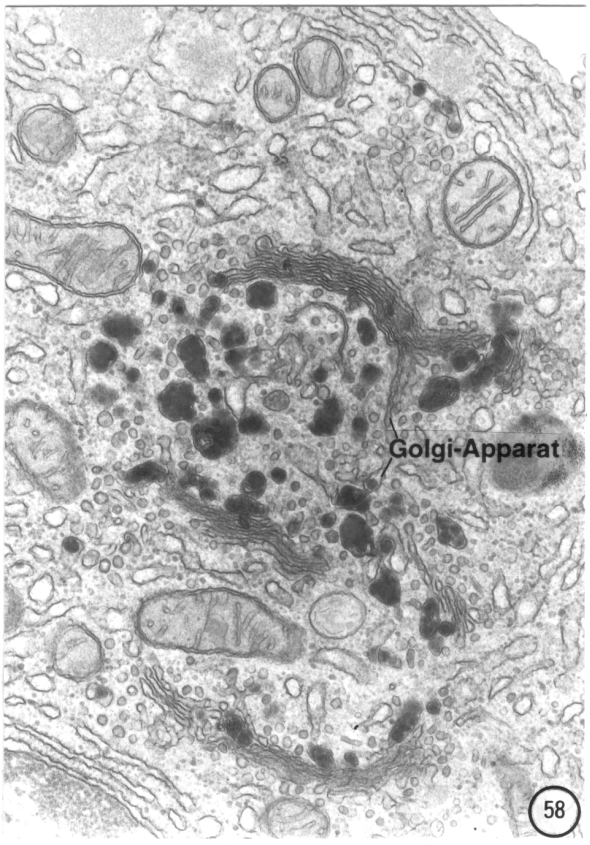

RER
Kern
Lysosomen
50

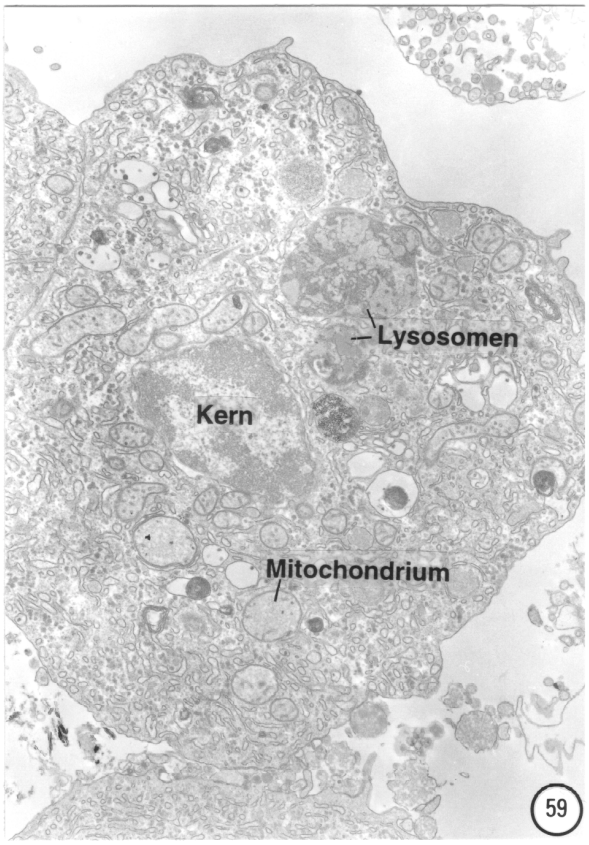

Nucleolus
Peroxisomen
RER
51

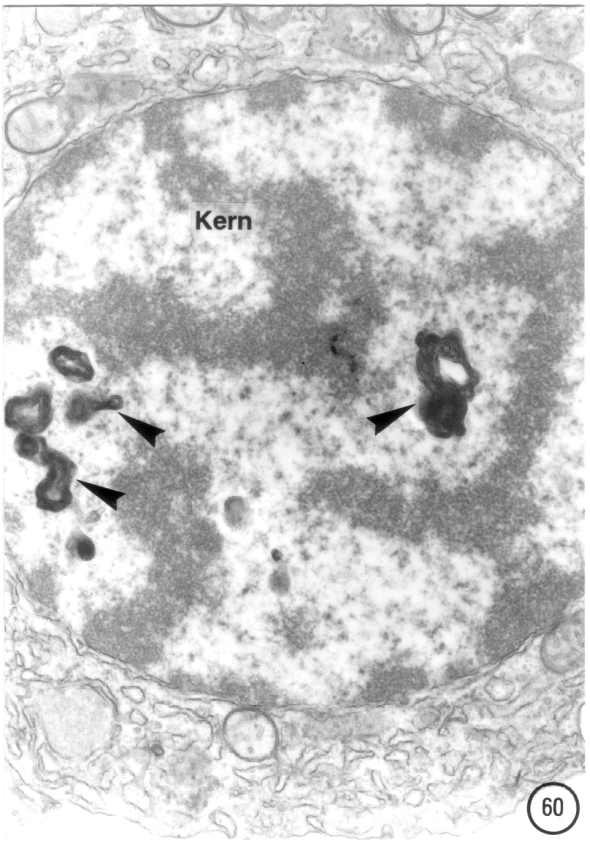

Myelinkörper
Mitochondrien
Lysosom
Peroxisomen
52

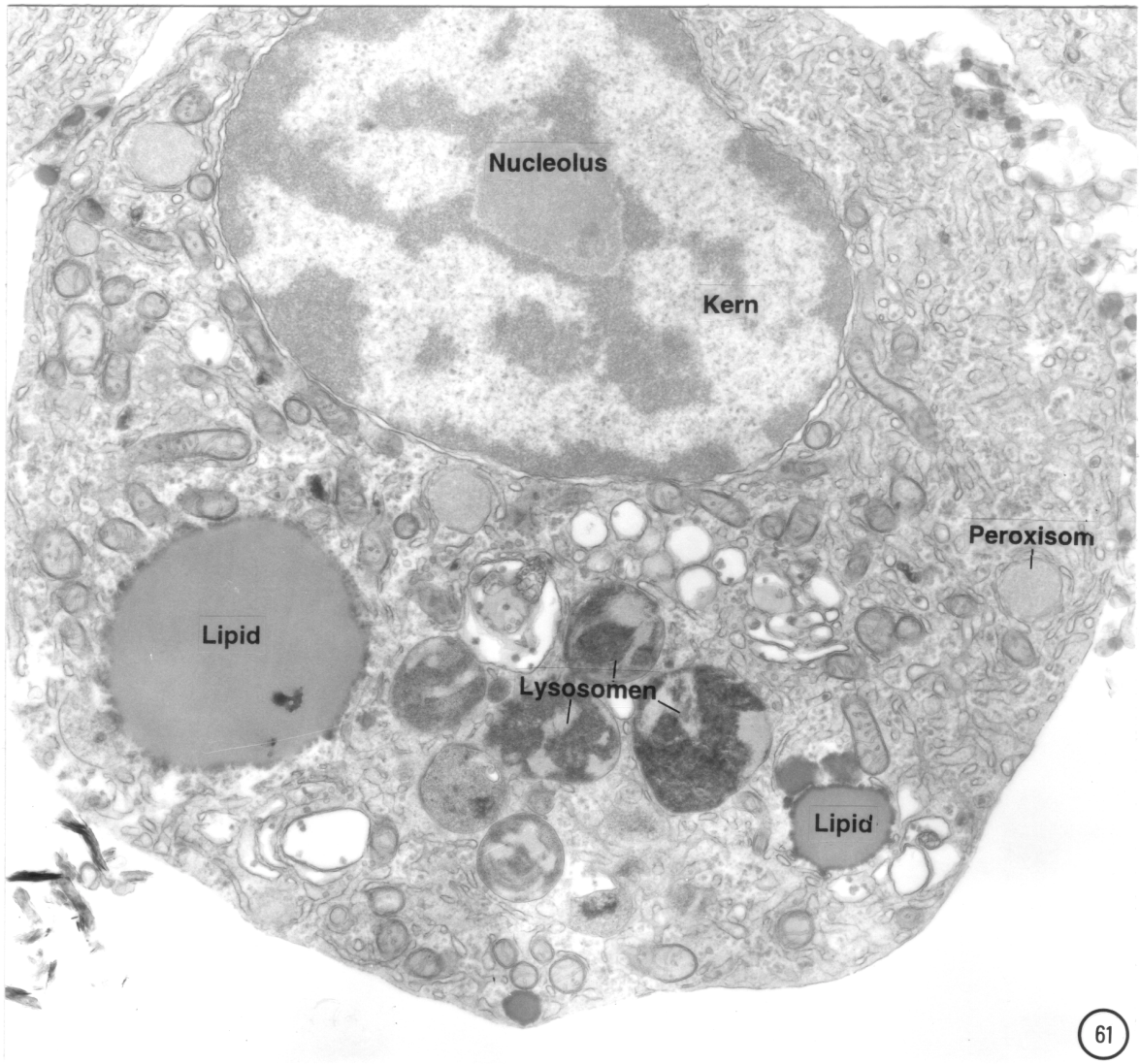

Lipid
Kern
RER
Peroxisomen
53
Kern
Lysosom
54
ER-Wirbel
Kern
55
56

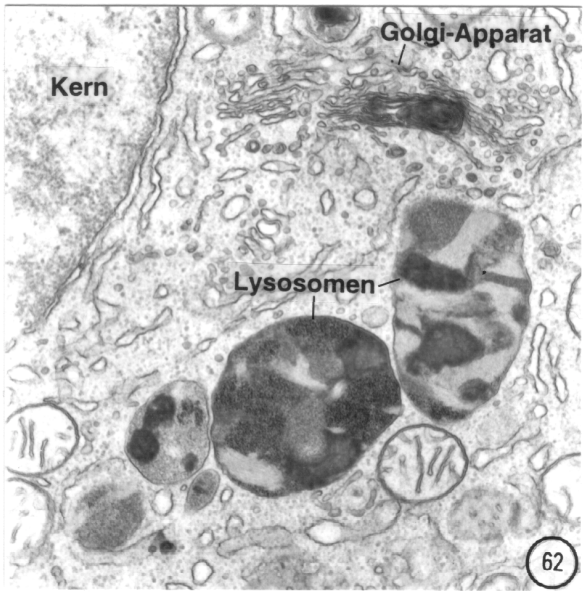

Mitochondrien
Vakuole
Vakuole
57

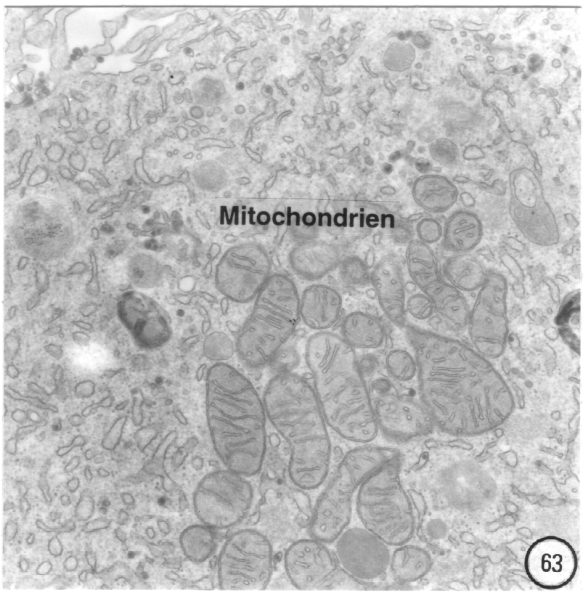

Golgi-Apparat
58


Lysosomen
Kern
Mitochondrium
59


Kern
60


Nucleolus
Kern
Peroxisom
Lipid
Lysosomen
Lipid
61


Golgi-Apparat
Kern
Lysosomen
62


Mitochondrien
63

Diskussion

Wäßrige Eluate sollen eine vollständige Remobilisierung und Oxidation des Sedimentes simulieren (Ahlf, 1995). Jedoch ist aus vorangehenden Studien bekannt, daß sie das tatsächlich bioverfügbare Maß an Schadstoffen unterbewerten (Harkey et al., 1994).

Die mit wäßrigen Sedimenteluat von Krähenbach und Körsch belasteten Primärhepatocyten zeigten zahlreiche zeit- und dosisabhängige cytopathologische Effekte in den belasteten Zellen. Dabei waren einige cytologische Veränderungen wie eine veränderte Zellform, das Auftreten von Kerneinschlüssen, eine Lageveränderung des Kernes, eine Vermehrung von Nucleoli als auch Myelinakkumulationen an Mitochondrien sowie in ER-Zisternen rein körschspezifisch.

Vorherige Seiten

Abb. 4.49 – 4.52. *Wäßriges Eluat aus Krähenbach Sediment*. In den mit mit einer 1:3-Verdünnung belasteten Zellen war eine leichte Vesikulierung des RER zu beobachten (Abb. 4.49). Außerdem traten im Cytoplasma sehr große Lysosomen auf (Abb. 4.50) und die Anzahl an Peroxisomen hatte zugenommen (Abb. 4.51). Neben einer Ausbildung von Peroxisomencluster waren im Cytoplasma häufiger Myelinkörper zu sehen (Abb. 4.52).

Abb. 4.49: Verdünnung 1:3, 1 d x 8400; Abb. 4.50: Verdünnung 1:3, 2 d x 8200; Abb. 4.51: Verdünnung 1:3, 1 d x 7400; Abb. 4.52: Verdünnung 1:3, 2 d x 10800.

Abb. 4.53 – 4.56. *Wäßriges Eluat aus Körsch Sediment*. Nach einer Belastung mit wäßrigen Eluat aus Körsch Sediment bildeten die Mitochondrien und Peroxisomen öfter enge Assoziationen zu Zisternen des RER (Abb. 4.53). Desweiteren traten im Cytoplasma vermehrt Lysosomen und Vakuolen auf (Abb. 4.54). Bei den mit der 1:3-Verdünnung belasteten Zellen konnten teilweise konzentrische RER-Wirbel beobachtet werden (Abb. 4.55). Einige Hepatocyten zeigten einen deutlichen Anstieg des SER-Gehaltes (Abb. 4.56).

Abb. 4.53: Verdünnung 1:4, 1 d x 10300; Abb. 4.54: Verdünnung 1:4, 2 d x 8500; Abb. 4.55: Verdünnung 1:3, 1 d x 8500; Abb. 4.56: Verdünnung 1:3, 1 d x 17000.

Abb. 4.57 - 60. *Wäßriges Eluat aus Körsch Sediment*. Neben einer verstärkten Vesikulierung des RER konnten im Cytoplasma teilweise sehr große Vakuolen beobachtet werden (Abb. 4.57). Der Golgi-Apparat war zunehmend desorganisiert und schnürte stark elektronendichte Vesikel ab (Abb. 4.58). Nach einer Belastungsdauer von 2 d war in den mit Körsch Eluat belasteten Zellen die cytoplasmatische Kompartimentierung völlig aufgehoben (Abb. 4.59) und in einigen Zellkernen waren Einschlüsse zu sehen (Abb. 4.60).

Abb. 4.57: Verdünnung 1:3, 1 d x 10100; Abb. 4.58: Verdünnung 1:3, 1 d x 37000; Abb. 4.59: Verdünnung 1:3, 2 d x 7800; Abb. 4.60: Verdünnung 1:3, 2 d x 16600.

Abb. 4.61 - 63. *Wäßriges Eluat aus Körsch Sediment*. Bei den mit der 1:3-Verdünnung des wäßrigen Eluats aus Körsch Sediment belasteten Primärhepatocyten traten im Cytoplasma viele sehr große Lysosomen, Vakuolen und Lipidtropfen auf (Abb. 4.61). In den Zisternen einiger Dictyosomen konnten myelinartige Strukturen beobachtet werden (Abb. 4.62), während die Mitochondrien zunehmend elektronendichter wirkten (Abb. 4.63).

Abb. 4.61: Verdünnung 1:3, 2 d x 15500; Abb. 4.62: Verdünnung 1:3, 2 d x 21500; Abb. 4.63: Verdünnung 1:3, 1 d x 17700.

Ultrastrukturell konnten in den isolierten Hepatocyten u.a. starke Veränderungen am endoplasmatischen Retikulum beobachtet werden wie eine Abnahme der Stapelbildung und eine auffällige Fragmentierung und Vesikulierung der ER-Zisternen. Ein Vergleich mit den biochemischen Befunden zeigt sowohl einen Rückgang der unspezifischen Esteraseaktivität in den Zellen nach einer eintägigen Exposition mit wäßrigen Sedimenteluat der Körsch als auch eine Zunahme der Lipidperoxidationsrate.

Die Ursache ist in einer verstärkten Schädigung von Membranen zu suchen, die mit einer Abnahme der Aktivität membrangebundener Enzyme wie Esterasen oder Monooxygenasen einhergeht (Plaa & Whitschi, 1976).

Im ultrastrukturellen Bild konnte desweiteren eine starke Proliferation und Akkumulation von Peroxisomen als auch gravierenden Schädigungen am RER und den Mitochondrien beobachtet werden. Die Zunahme von Mitochondrien mit myelinartigen Akkumulationen ist ein Indiz für starke Schädigungen der betroffenen Zellorganellen und als degenerative Reaktion der Zellen zu deuten. Diese Effekte gehen einher mit der auffälligen Aktivitätszunahme der Katalase sowie dem enormen Anstieg der Lipidperoxidationsrate besonders für die Körsch bei der Probennahme Juli 1997.

Ein Vergleich zur chemischen Analyse ergibt für die Probennahme Juli 1997 eine hohe Belastung vor allem des Körschsedimentes mit PAHs von 801,4 mg/kg sowie 0,223 mg/kg Zink (Honnen et al., 1999a). Gerade die nachgewiesenen Schwermetalle (Cadmium, Kupfer, Zink, Blei) und die hydrophilen PAHs könnten einen wichtigen cytotoxischen Beitrag am Reaktionsmuster der mit Sediment-eluat belasteten Zellen leisten.

Nach Bowen und Wyllie (1984) sind Veränderungen wie eine Kondensierung des Heterochromatin, verstärkt morphologisch heterogene Mitochondrien mit myelinartigen Akkumulationen an Mitochondrien, Zunahme von Lysosomen, Vesikulierung und Dilatation von RER-Zisternen Zeichen einer noch reversiblen praenekrotischen Phase, welche jedoch nach Verlust der cytoplasmatischen Kompartimentierung sowie weiteren Defekten zum endgültigen Tod der Zelle führen.

4.3.5 Ultrastrukturelle Untersuchungen zur Wirkung von acetonischen Sedimentextrakten auf isolierte Hepatocyten

Die semiquantitativen morphologischen Befunde der Probennahmen Juli 1996, 1997 und 1998 sind in Tabelle 4.10 a,b zusammengefaßt.

Kontrolle (0,1 % DMSO)

Die mit 0,1 % DMSO belasteten Kontrollhepatocyten zeigten das charakteristische morphologische Erscheinungsbild (vgl. Kapitel 4.3.1).

Krähenbach Aceton-Extrakt (1:4)

Die isolierten Hepatocyten der Regenbogenforelle, die mit acetonischem Sedimentextrakt aus dem Krähenbach (1:4) belastet wurden, zeigten nach 1 d bei allen Proben eine Verschlechterung der cytoplasmatischen Kompartimentierung (Abb. 4.64). Neben einer Zunahme an diffus verteiltem Heterochromatin (Abb. 4.65) war bei einigen Zellkernen eine dilatierte Kernhülle (Abb. 4.68) zu beobachten. Die gleichmäßig verteilten Mitochondrien zeigten die Tendenz, heterogene Formen und Größen auszubilden (Abb. 4.70). Häufig waren die mitochondrialen Cristae aufgelöst. Bei allen Sedimentproben lagen die Mitochondrien eng benachbart zu Peroxisomen sowie vesikulierten Zisternen

Tab. 4.10a: Semiquantitative Analyse cytologischer Veränderungen in isolierten Hepatocyten nach Belastung mit acetonischem Sedimentextrakt aus Krähenbach und Körsch (Probennahmen Juli 1996, Juli 1997, Juli 1998).

			Jul 96	1d			Jul 97	1d			Jul 98	1d	
	Ko	Krä 1:4	Kö 1:4	Krä 1:2	Kö 1:2	Krä 1:4	Kö 1:4	Krä 1:2	Kö 1:2	Krä 1:4	Kö 1:4	Krä 1:2	Kö 1:2
Veränderte Zellform	±	±	±	±	±	±	+	+	++	±	±	±	++
Kompartimentierung	+++	+++	++	++	+	+++	++	++	+	+++	++	++	+
Kern													
Veränderte Kernform	±	±	±	±	+	±	+	+	++	±	±	±	+
Dilatation der Kernhülle	±	+	+	++	++	±	±	±	±	±	±	±	±
Heterochromatin Zunahme	±	+	+	++	+++	±	++	+	+++	±	+	+	++
Marginalisierung	±	±	±	±	±	±	+	+	++	±	±	±	±
Lageveränderung des Kernes	±	±	±	±	±	±	+	±	+	±	±	±	±
Kerneinschlüsse	±	±	±	±	±	±	±	±	+	±	±	±	±
Abnahme von Nucleoli	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	+	+	+
Vermehrung von Nucleoli	±	±	±	±	±	±	±	±	+	±	±	±	±
Mitochondrien													
Erhöhte Heterogenität	±	+	+	++	++	±	++	+	++	±	+	+	++
Akkumulationen	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	+	+	+
Assoziation mit ER-Cisternen	+	+	+	+	+	++	+++	+++	++	++	+	+	+
Assoziation mit Peroxisomen	±	+	+	+	++	+	++	+	+++	++	++	++	++
Myelinakkumulation	±	±	±	±	±	±	++	+	+++	±	±	±	±
Auflösung der Cristae	±	+	+	+	++	+	++	++	+++	±	+	+	++
RER													
Menge	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
Stapelbildung	+++	+++	++	+++	++	+++	++	+++	+	+++	++	++	+
Dilatation	±	+	+	++	++	±	±	±	±	±	±	±	±
Vesiculierung	±	+	+	++	+++	+	+++	++	+++	+	++	++	+++
Assoziation mit Peroxisomen	±	+	+	+	+	±	±	±	±	++	++	+	++
Kristalle in RER-Zisternen	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
SER													
Menge	+	+	+	++	++	+	++	+	+++	+	+	+	++
Golgi-Apparat													
Dilatation der Zisternen	±	±	+	+	++	+	++	++	++	±	+	+	+
Fragmentierung der Zisternen	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	+	+	+
Langgestreckte Zisternen	±	±	±	±	±	±	±	+	±	±	±	±	±
Myelin in Golgi-Zisternen	±	±	±	±	±	±	+	±	++	±	±	±	±
Aktivität	++	++	++	+	+	+++	++	++	++	+++	++	+	+
Lysosomen													
Primäre Lysosomen	+	+	++	++	+++	++	++	++	+++	+	++	++	+++
Sek. und tert. Lysosomen	±	+	++	++	+++	±	++	+	+++	+	++	++	+++
Vakuolen	±	±	±	±	±	+	+	+	+++	±	±	±	±
Myelinkörper	±	±	±	±	±	+	++	+	+++	±	+	±	+
Myelinakkum. an Lipid	±	±	±	±	±	±	±	±	+	±	±	±	±
Peroxisomen													
Menge	+	+	++	++	+++	++	+++	++	+++	+	++	++	++
Akkumulationen	±	±	+	+	++	±	++	++	+++	+	++	++	++
Lipid													
Menge	+	+	++	++	+++	+	++	+	+++	+	++	++	++
Lipidfelder	±	±	±	±	±	±	+	±	++	±	±	±	±
Glykogen													
Menge	++++	++	++	+	+	+++	++	+++	+	+++	+++	+++	++

Zeichenerklärungen: ± = fehlend; + = schwach; ++ = vorhanden; +++ = stark; ++++ = sehr stark; Krä = Krähenbach, Kö = Körsch; n = 50 Zellen.

Tab. 4.10b: Semiquantitative Analyse cytologischer Veränderungen in isolierten Hepatocyten nach Belastung mit acetonischem Sedimentextrakt aus Krähenbach und Körsch (Probennahmen Juli 1996, Juli 1997, Juli 1998).

			Jul 96	2d			Jul 97	2d			Jul 98	2d	
	Ko	Krä 1:4	Kö 1:4	Krä 1:2	Kö 1:2	Krä 1:4	Kö 1:4	Krä 1:2	Kö 1:2	Krä 1:4	Kö 1:4	Krä 1:2	Kö 1:2
Veränderte Zellform	±	±	+	±	++	±	+	+	++	±	+	±	++
Kompartimentierung	+++	++	+	+	±	++	+	+	±	++	+	+	±
Kern													
Veränderte Kernform	±	+	+	+	++	±	++	++	+++	±	+	+	++
Dilatation der Kernhülle	±	+	++	++	+++	±	±	±	±	±	±	±	±
Heterochromatin Zunahme	±	++	+++	++	++++	+	++	++	+++	+	++	++	+++
Marginalisierung	±	±	±	±	±	+	++	++	+++	±	±	±	±
Lageveränderung des Kernes	±	+	+	+	++	+	++	+	++	±	±	+	±
Kerneinschlüsse	±	±	±	±	±	±	±	±	+	±	±	±	±
Abnahme von Nucleoli	±	±	±	±	±	±	±	±	±	+	+	+	++
Vermehrung von Nucleoli	±	±	±	±	±	±	±	±	+	±	±	±	±
Mitochondrien													
Erhöhte Heterogenität	±	+	++	++	+++	±	++	+	+++	+	++	++	+++
Akkumulationen	±	±	±	±	±	±	±	±	±	+	+	+	+
Assoziation mit ER-Cisternen	+	+	+	+	+	++	+++	+++	++	+++	+	+	±
Assoziation mit Peroxisomen	±	+	++	++	++	+	++	++	++	+++	++	++	++
Myelinakkumulation	±	±	±	±	±	±	+++	+	+++	±	±	±	±
Auflösung der Cristae	±	+	++	++	+++	++	+++	+++	++++	+	++	++	+++
RER													
Menge	+++	++	++	++	+	+++	++	++	++	+++	+++	+++	++
Stapelbildung	+++	++	+	+	+	++	++	++	+	++	+	+	+
Dilatation	±	+	+	+++	+++	±	±	±	±	±	±	±	±
Vesiculierung	+	++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++++
Assoziation mit Peroxisomen	±	+	+	++	++	±	±	±	±	+++	++	+	++
Kristalle in RER-Zisternen	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	+
SER													
Menge	+	+	+	++	++	+	++	++	+++	++	++	++	++
Golgi-Apparat													
Dilatation der Zisternen	±	+	+	++	++	++	++	++	+++	±	+	+	++
Fragmentierung der Zisternen	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	+	+	++
Langgestreckte Zisternen	±	±	±	±	±	±	±	+	±	±	±	±	±
Myelin in ER-Zisternen	±	±	±	±	±	±	+	±	++	±	±	±	±
Aktivität	++	++	++	+	+	++	+	++	+	+++	+	+	±
Lysosomen													
Primäre Lysosomen	++	++	+++	+++	++++	++	+++	++	+++	++	++	++	++++
Sek. und tert. Lysosomen	+	++	+++	+++	++++	±	++	+	+++	++	++	++	++++
Vakuolen	±	±	±	±	±	+	++	++	+++	±	±	±	+
Myelinkörper	±	±	±	±	±	+	+++	++	++++	±	+	±	++
Myelinakkum. an Lipid	±	±	±	±	±	±	±	±	+	±	±	±	±
Peroxisomen													
Menge	+	++	++	+++	+++	++	+++	+++	++++	++	+++	+++	+++
Akkumulationen	±	+	+	++	++	+	+++	++	+++	++	++	++	+++
Lipid													
Menge	+	+	++	++	+++	++	+++	++	+++	++	++	++	+++
Lipidfelder	±	±	±	±	±	+	++	+	++	±	±	±	±
Glykogen													
Menge	+++	+	+	+	±	++	+	++	±	+++	++	++	+

Zeichenerklärungen: ± = fehlend; + = schwach; ++ = vorhanden; +++ = stark; ++++ = sehr stark; Krä = Krähenbach, Kö = Körsch; n = 50 Zellen.

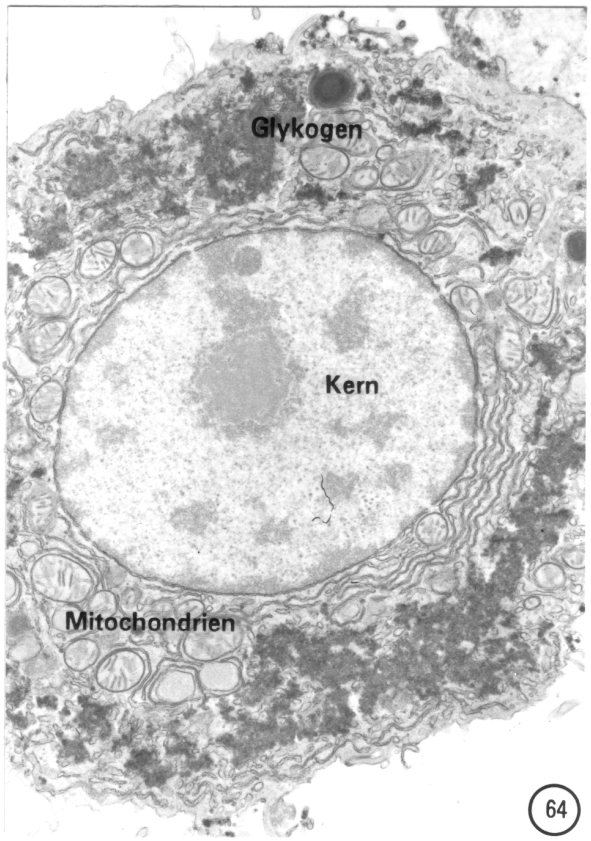
des RER, welche auch Assoziationen mit Peroxisomen bildeten (Abb. 4.69). Weitere Veränderungen waren dilatierte Zisternen des Golgi-Apparates (Abb. 4.65) wie auch eine erhöhte Golgi-Aktivität. Neben einer erhöhten Anzahl an Lysosomen (Abb. 4.66) und Peroxisomen (Abb. 4.65) konnten Vakuolen und Myelinkörper (Abb. 4.66) beobachtet werden.
Nach einer 2 d Belastung kam es zu einer Zunahme der bereits beschriebenen Effekte und dem Auftreten weiterer ultrastruktureller Veränderungen. In den Hepatocyten traten Zellkerne mit unregelmäßigem Umriß, einer Marginalisierung des Heterochromatins (Abb. 4.66, Pfeilköpfe), einer Verlagerung der Kerne in die Zellperipherie (Abb. 4.66) sowie einer Abnahme von Nucleoli auf. Weiterhin kam es zu einem Rückgang des RER-Gehaltes und einer Abnahme von RER-Stapeln. Dagegen nahm der SER-Gehalt zu. Während in belasteten Zellen öfter kleine und große Lipidtropfen auftraten (Abb. 4.66) ging der Gehalt an Glykogen zurück (Abb. 4.68).

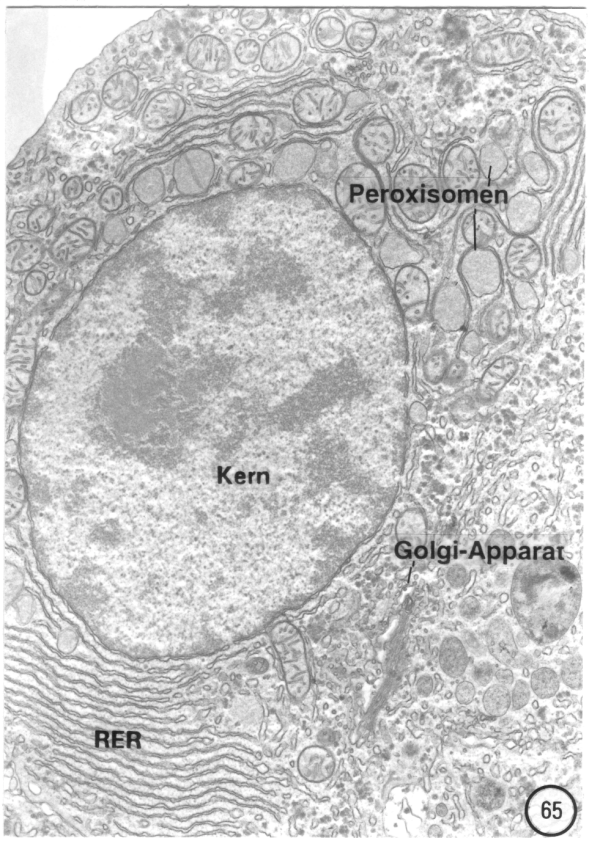
Krähenbach Aceton-Extrakt (1:2)

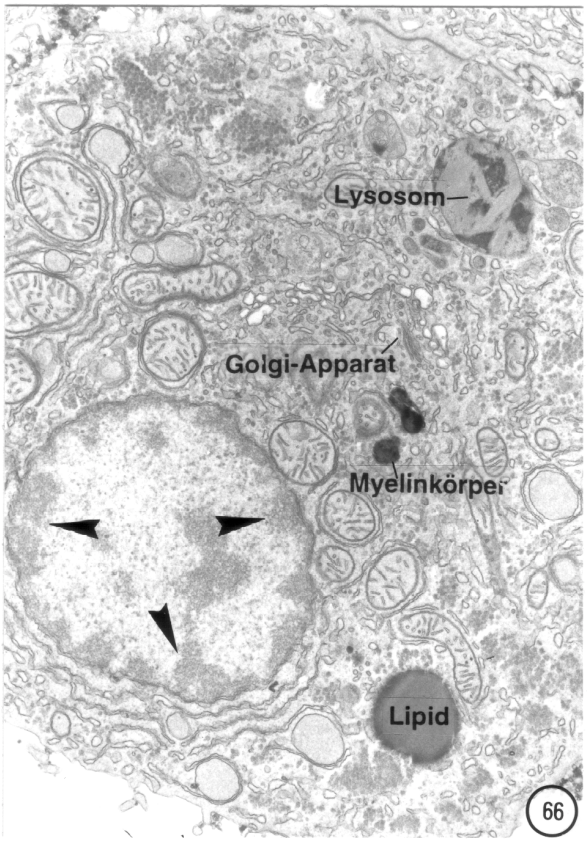
Bei den mit Krähenbach Aceton-Extrakt (1:2) belasteten Primärhepatocyten war die cytoplasmatische Kompartimentierung meist aufgehoben (Abb. 4.68). Nur bei der Probennahme Juli 1997 zeigten die Hepatocyten eine veränderte Zell- als auch Kernform. Im Vergleich zum Aceton Extrakt (1:4) konnte man eine Abnahme von Nucleoli beobachten. Die mitochondriale Matrix wirkte elektronendicht. Die Cristae waren aufgelöst. Myelinartige Strukturen fanden sich an Mitochondrienmembranen. Die RER-Zisternen waren häufig dilatiert und vesikuliert. Die Dictyosomen zeigten einen Aktivitätsrückgang, als auch dilatierte, fragmentierte und bisweilen sehr langgestreckte Zisternen (Abb. 4.67).
In den 2 d belasteten Zellen traten die beschriebenen Effekte verstärkt auf. Außerdem waren die Kerne in die Zellperipherie verlagert (Abb. 4.66). Auffällig war bei allen Sedimentproben die Vesikulierung des RER (Abb. 4.66, 4.68).

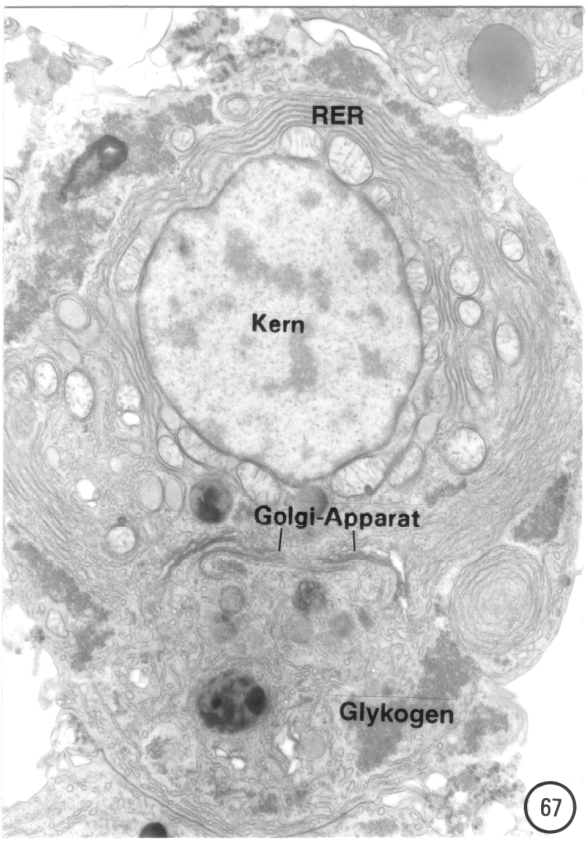
Körsch Aceton-Extrakt (1:4)

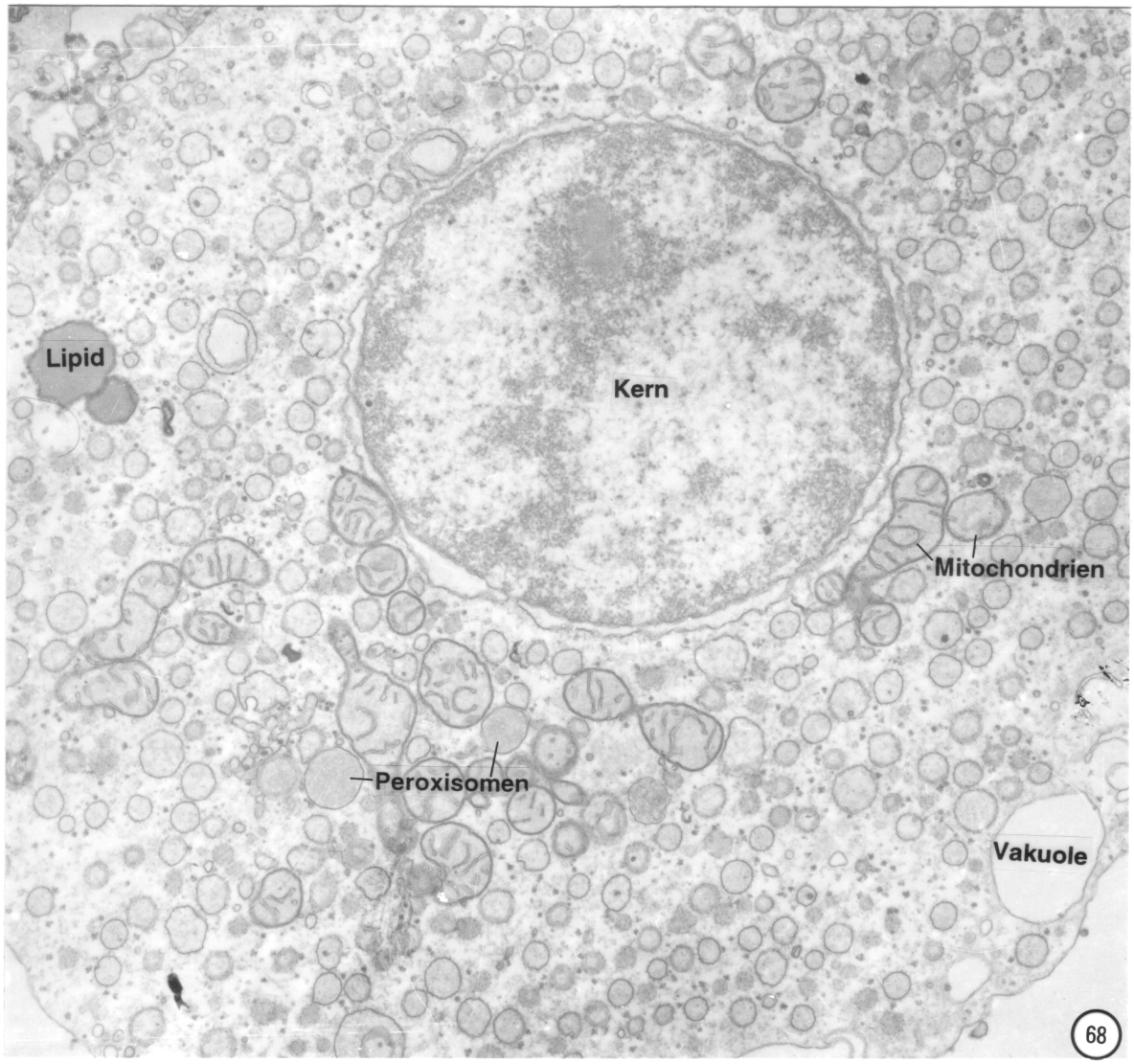
Bei den mit Körsch Aceton-Extrakt (1:4) belasteten isolierten Hepatocyten konnte man nach 1 d bei allen Proben eine Abnahme der cytoplasmatischen Kompartimentierung erkennen. Neben einer unregelmäßigen Kernform (Abb. 4.71, Pfeilköpfe), dilatierter Kernhülle (Abb. 4.71, Pfeilköpfe) und einer Abnahme von Nucleoli konnte man bei allen Sedimentproben eine deutliche Heterochromatinzunahme und Marginalisierung (Abb. 4.71, 4.76, 4.82) in den Zellkernen feststellen. An den Mitochondrien traten Veränderungen auf wie eine Zunahme heterogener Formen und Größen sowie verstärkte Auflösung der mitochondrialen Cristae (Abb. 4.81, 4.82). Es fanden sich enge Assoziationen der Mitochondrien mit RER-Zisternen (Abb. 4.73) und Peroxisomen (Abb. 4.74) sowie myelinartige Ansammlungen an den Mitochondrienmembranen (Abb. 4.72, Pfeilkopf). Weitere morphologische Veränderungen waren eine Zunahme des SER-Gehaltes (Abb. 4.73, 4.75), Dictyosomen mit dilatierten und fragmentierten Zisternen (Abb. 4.81), welche vereinzelt myelinartige Strukturen enthielten (Abb. 4.80), ein deutlicher Anstieg der Anzahl von Lysosomen (Abb. 4.83), Peroxisomen und Peroxisomenclustern (Abb. 4.74) sowie das seltene Auftreten von Vakuolen und Myelinkörpern (Abb. 4.76). Während bei allen Probennahmen im Cytoplasma kleine und größere Lipidtropfen auftraten (Abb. 4.77), zeigten die Zellen eine Reduktion der Glykogenspeicher.
Alle nach 1 d gefundenen morphologischen Effekte traten verstärkt auch nach 2 d Belastungsdauer auf. Bei allen untersuchten Sedimentproben zeigten die belasteten Hepatocyten außerdem eine unregelmäßige Zellform (Abb. 4.78), sowie eine völlige Aufhebung der cytoplasmatischen Kompartimentierung (Abb. 4.76, 4.79).

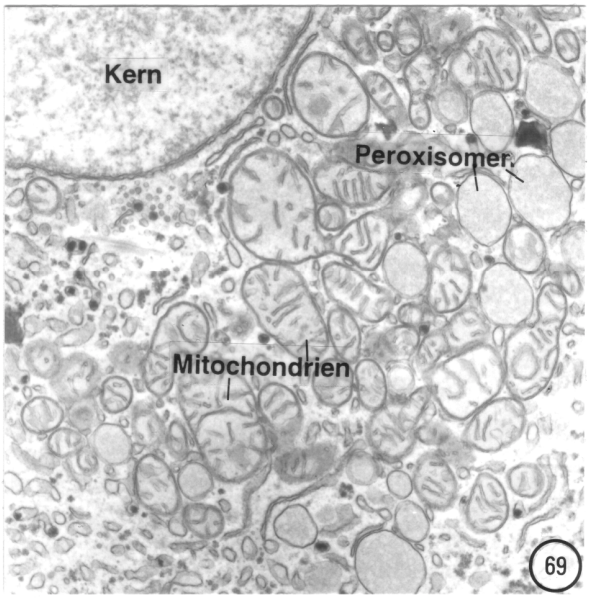

Glykogen
Kern
Mitochondrien
64

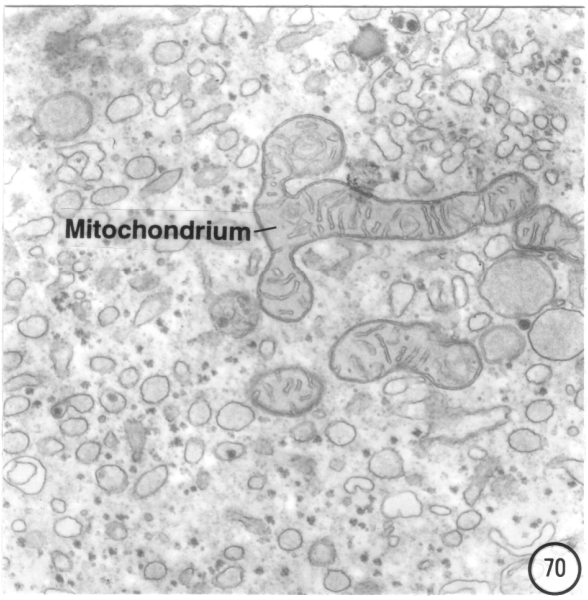

Peroxisomen
Kern
Golgi-Apparat
RER
65


Lysosom
Golgi-Apparat
Myelinkörper
Lipid
66


RER
Kern
Golgi-Apparat
Glykogen
67


Lipid
Kern
Mitochondrien
Peroxisomen
Vakuole
68


Kern
Peroxisomen
Mitochondrien
69


Mitochondrium
70

Körsch Aceton-Extrakt (1:2)

Beim Körsch Aceton-Extrakt (1:2) traten die bereits geschilderten morphologischen Veränderungen stärker und früher auf. Schon nach 1 d war bei allen Proben in den Primärhepatocyten keine cytoplasmatische Kompartimentierung mehr erkennbar (Abb. 4.71). Die Zellen bildeten starke Ausbuchtungen der Zellmembran (Abb. 4.78). Neben einer ausgeprägten Zunahme an Heterochromatin konnte man in einigen Zellkernen sowohl Einschlüsse (Abb. 4.76, Pfeilkopf) als auch eine Abnahme und eine Vermehrung von Nucleoli beobachten. Desweiteren zeigten die belasteten Zellen eine Abnahme des RER-Gehaltes. Vor allem bei der Probennahme vom Juli 1997 traten verstärkt Vakuolen, Myelinkörper, myelinartige Akkumulationen um Lipidtropfen als auch Felder aus mehreren Lipidtropfen (Abb. 4.76) auf.

Nach einer Belastungsdauer von 2 d schritten die bereits beschriebenen degenerativen Effekte in den belasteten Zellen weiter voran. Ihr morphologisches Bild wurde beherrscht durch eine stark veränderte Zellform, großem Heterochromatingehalt, auffälliger Heterogenität der mitochondrialen Gestalt und Größe als auch völliger Auflösung der Cristae, der Vesikulierung von RER-Zisternen, einem Aktivitätsrückgang und der Dilatation von Dictyosomenzisternen, wie auch dem Auftreten vieler sehr großer Lysosomen (Abb. 4.79), Vakuolen (Abb. 4.82), Lipidtropfen und nur noch wenigen einzelnen Glykogenrosetten. Vereinzelt konnten Kristalle in dilatierten Zisternen des RER (Abb. 4.84) beobachtet werden.

Diskussion

Mit *acetonischen Extrakten* lassen sich hydrophobe Schadstoffe aus dem Sediment extrahieren bzw. mobilisieren und auf ihr cytotoxisches Potential hin untersuchen. Durch die Aufkonzentrierung können selbst geringe Mengen an umweltrelevanten Chemikalien in biologischen Testsystemen ein Schadbild ergeben und eine mögliche Bioakkumulation simulieren.

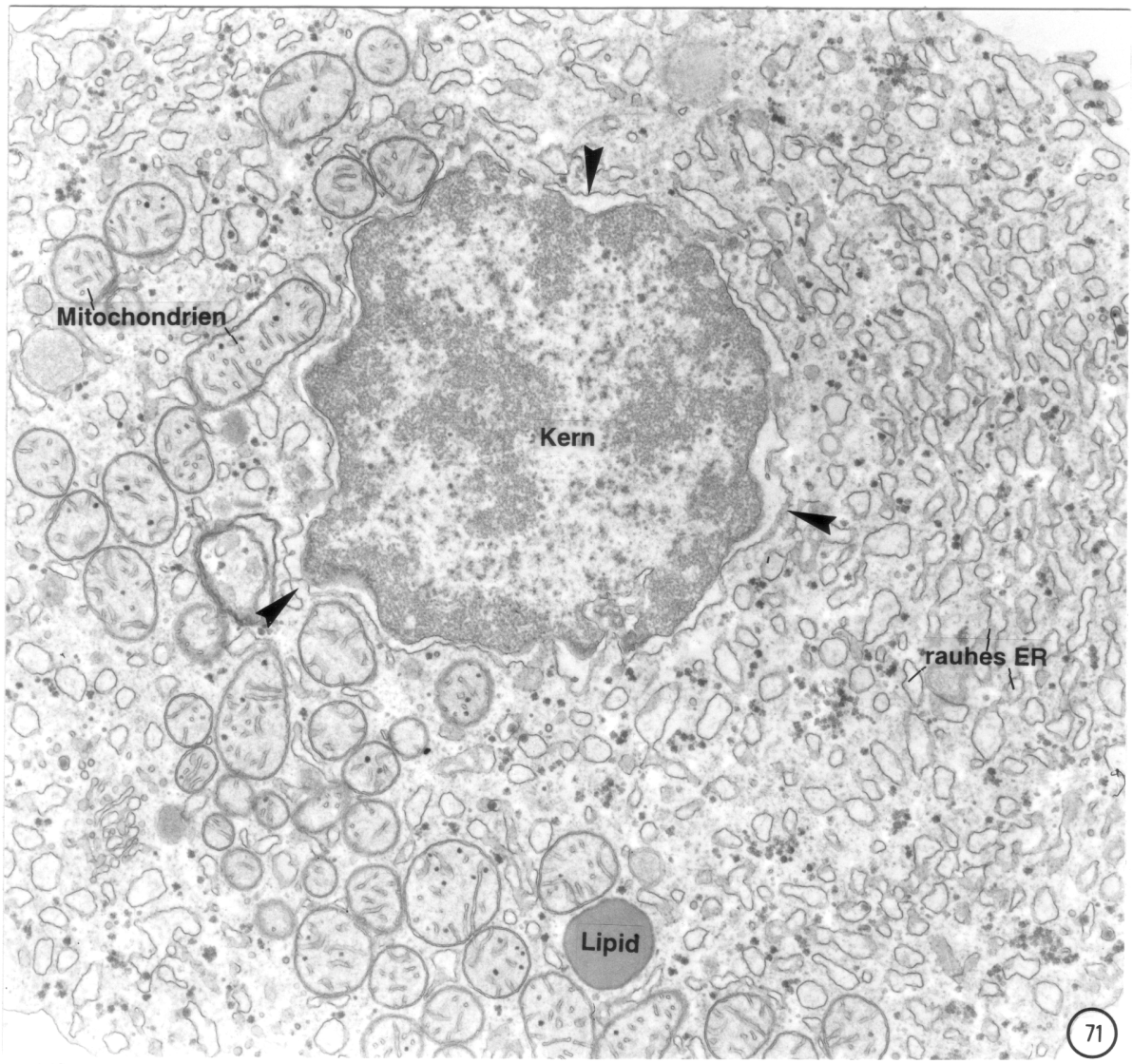
Vorherige Seiten

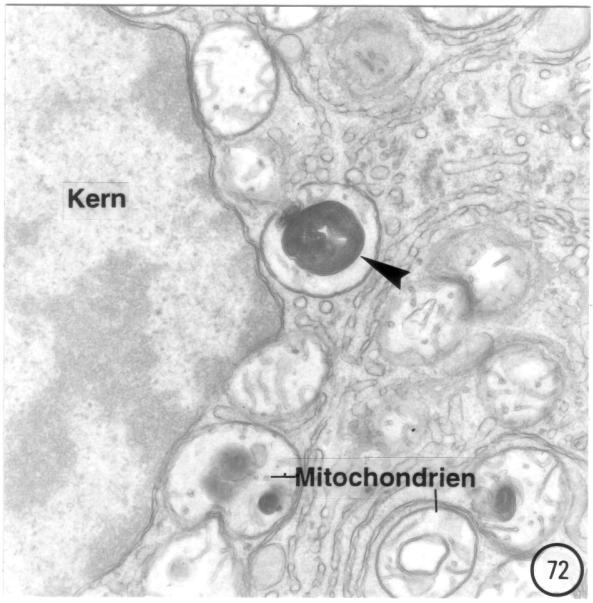
Abb. 4.64 - 67. *Sedimentextrakt aus dem Krähenbach*. Nach Belastung mit einer 1:4-Verdünnung lagen einige Mitochondrien eng benachbart zu Peroxisomen sowie Zisternen des RER (Abb. 4.64). Bei den mit der höchsten Konzentration mit acetonischen Sedimentextrakt belasteten isolierten Hepatocyten nahm die Anzahl von Peroxisomen (Abb. 4.65) sowie Lysosomen und Myelinkörpern zu (Abb. 4.66) zu. Weiterhin war eine Marginalisierung des Heterochromatin (Abb. 4.66) als auch das Auftreten von sehr langgestreckten Dictyosomen zu beobachten (Abb. 4.67).

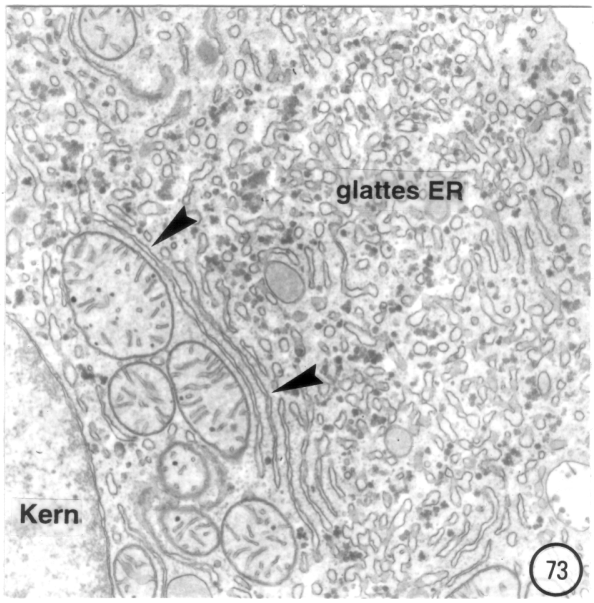
Abb. 4.64: Verdünnung 1:4, 1 d x 8400; Abb. 4.65: Verdünnung 1:2, 2 d x 9200; Abb. 4.66: Verdünnung 1:2, 2 d x 10900; Abb. 4.67: Verdünnung 1:2, 2 d x 6500.

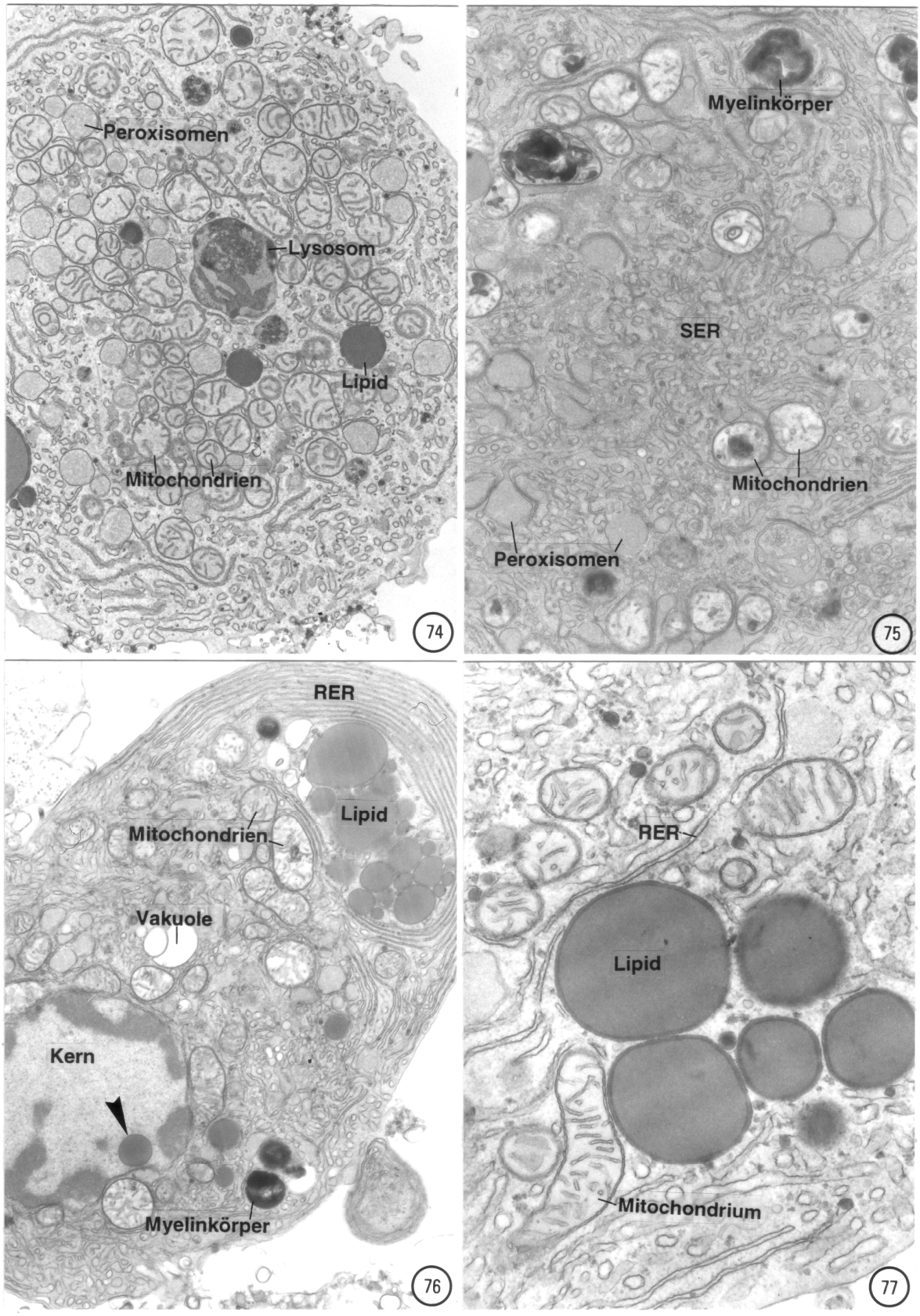
Abb. 4.68 - 70. *Sedimentextrakt aus dem Krähenbach*. In einigen Krähenbach Sedimentextrakt belasteten Zellen waren die Kernhüllen leicht dilatiert und die Zisternen des RER waren stark vesikuliert (Abb. 4.68). Neben einer zunehmenden Ausbildung von Peroxisomencluster (Abb. 4.69) waren öfter Mitochondrien mit heterogenen Größen und Formen zu beobachten (Abb. 4.70).

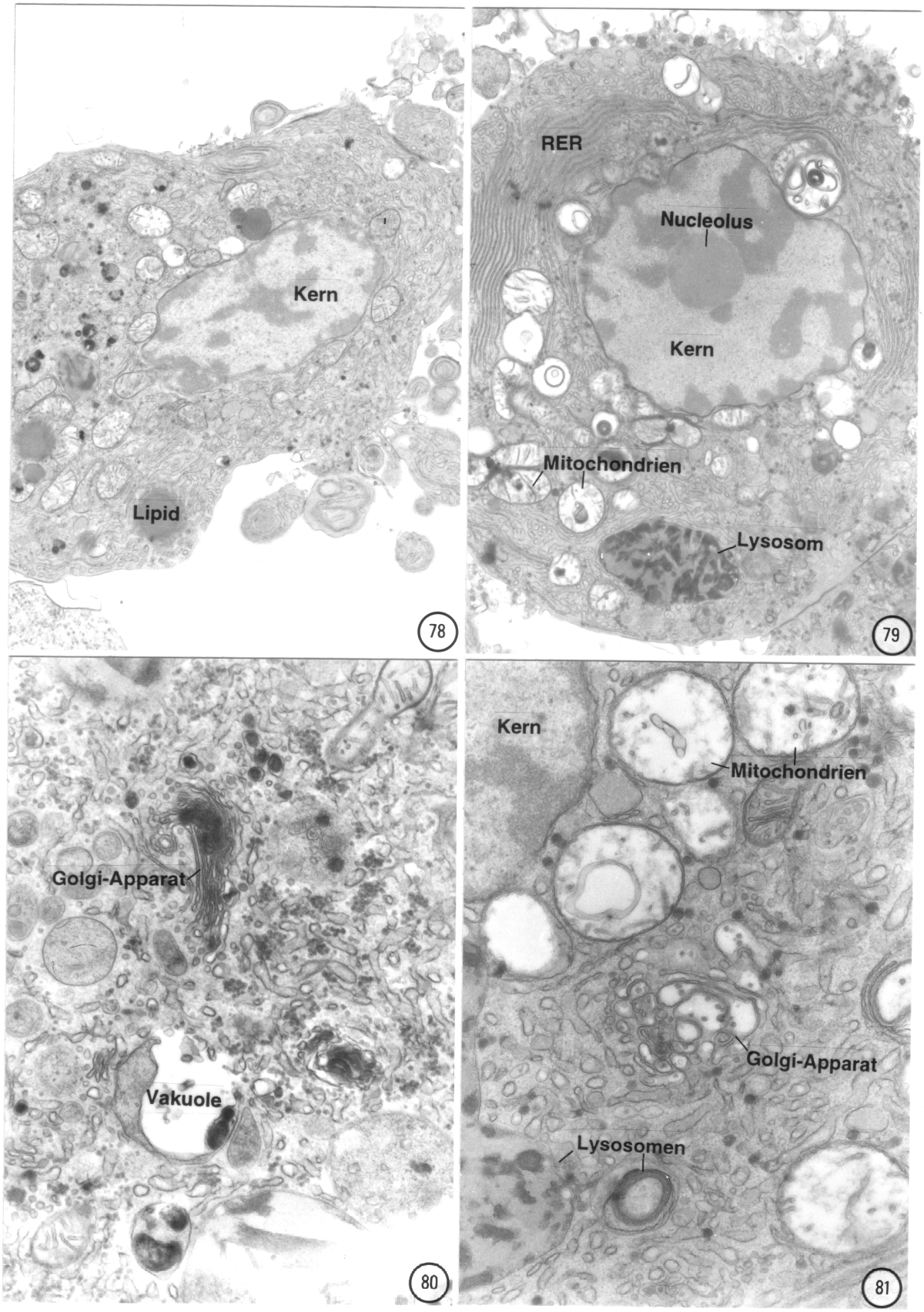
Abb. 4.68: Verdünnung 1:2, 2 d x 16600; Abb. 4.69: Verdünnung 1:2, 1 d x 13000; Abb. 4.70: Verdünnung 1:2, 1 d x 22200.

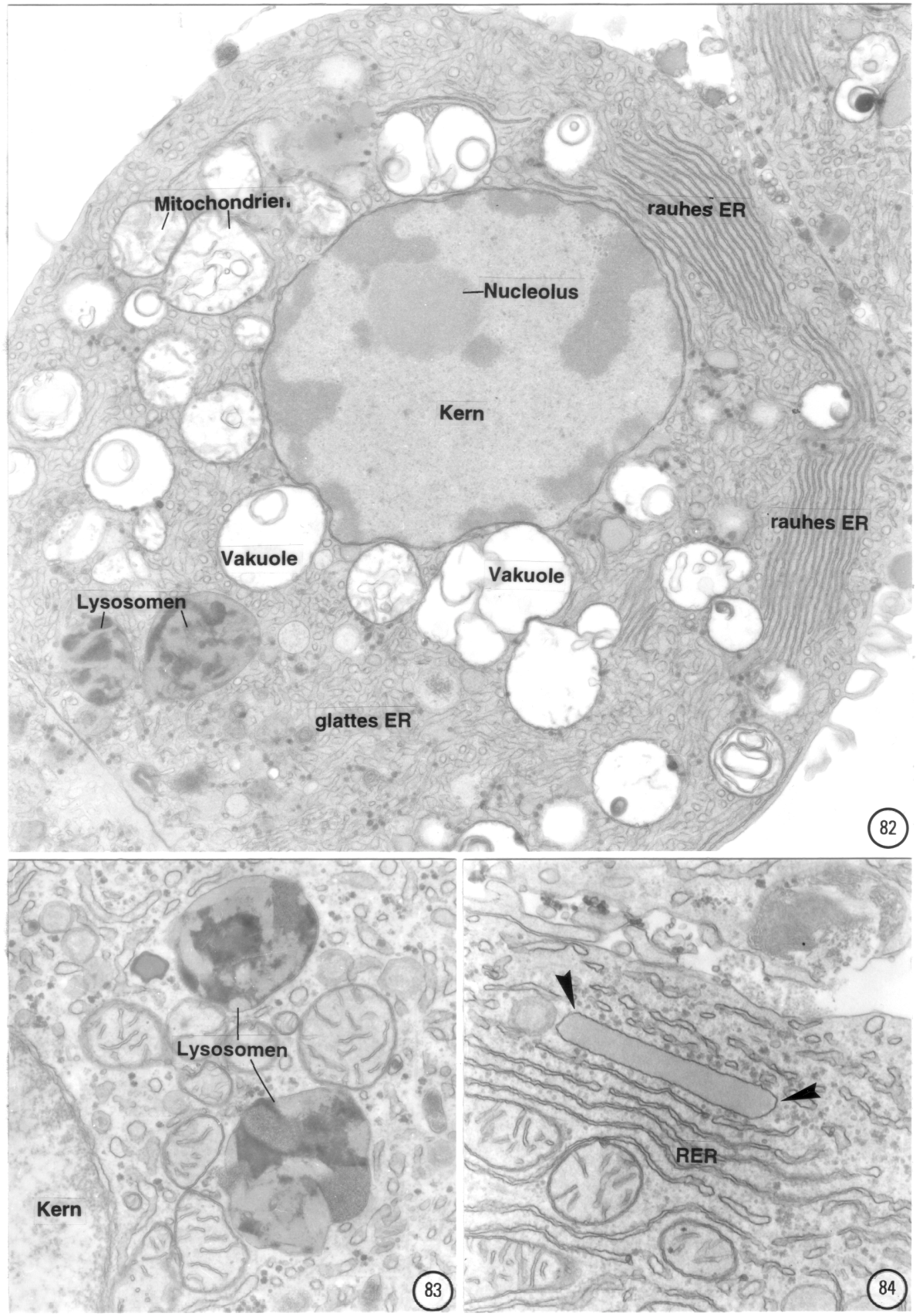

Mitochondrien
Kern
rauhes ER
Lipid
71


Kern
Mitochondrien
72


glattes ER
Kern
73


Peroxisomen
Lysosom
Lipid
Mitochondrien
74
Myelinkörper
SER
Mitochondrien
Peroxisomen
75
RER
Lipid
Mitochondrien
Vakuole
Kern
Myelinkörper
76
RER
Lipid
Mitochondrium
77


Kern
Lipid
78
RER
Nucleolus
Kern
Mitochondrien
Lysosom
79
Golgi-Apparat
Vakuole
80
Kern
Mitochondrien
Golgi-Apparat
Lysosomen
81


Mitochondrien
rauhes ER
Nucleolus
Kern
rauhes ER
Vakuole
Vakuole
Lysosomen
glattes ER
82
Lysosomen
Kern
83
RER
84

In mit *acetonischen Sedimentextrakten* aus Krähenbach und Körsch belasteten isolierten Hepatocyten waren bereits nach 1 d bei der niedrigsten Konzentration (13,3 mg Sedimenttrockengewicht pro mL Testansatz) ultrastrukturelle Effekte zu beobachten.

Die acetonischen Sedimentextrakte aus Krähenbach und Körsch verursachten in den isolierten Hepatocyten klare zeit- und dosisabhängige cytopathologische Effekte zu allen untersuchten Sedimentproben. Dabei bewirkten Proben aus der Körsch meist stärkere Abweichungen von den jeweiligen Kontrollzellen als die Proben aus dem Krähenbach. Des weiteren konnten auch beim acetonischen Sedimentextrakt rein körsch- bzw. krähenbachspezifische Veränderungen, wie Kerneinschlüsse, Vermehrung der Nucleolizahl, Myelinakkumulationen an Lipidtropfen, Proteinkristalle bei der Körsch als auch das Auftreten von Dictyosomen mit langgestreckten Zisternen beim Krähenbach beobachtet werden.

Vorherige Seiten

Abb. 4.71 - 73. *Sedimentextrakt aus der Körsch.* Bei den mit der höchsten Konzentration an acetonischen Sedimentextrakt belasteten isolierten Hepatocyten war in den meisten Zellen die klare cytoplasmatische Kompartimentierung bereits nach 1 d aufgehoben und die Kernhülle war stark dilatiert (Abb. 4.71, Pfeilköpfe). Einige der Mitochondrien besaßen myelinartige Strukturen an Mitochondrienmembranen (Abb. 4.72) waren teilweise eng zu RER-Zisternen assoziiert (Abb. 4.73).

Abb. 4.71: Verdünnung 1:2, 1 d x 16000; Abb. 4.72: Verdünnung 1:2, 1 d x 17000; Abb. 4.73: Verdünnung 1:2, 1 d x 13800.

Abb. 4.74 - 77. *Sedimentextrakt aus der Körsch.* Bei einigen Zellen lagen die Mitochondrien teilweise eng benachbart zu Peroxisomen (Abb. 4.74). Viele Peroxisomen waren auch eng mit RER-Zisternen assoziiert und der Gehalt an SER hatte zugenommen (Abb. 4.75). Nach 2 d Belastungsdauer waren in wenigen Zellkernen Einschlüsse zu beobachten (Abb. 4.76, Pfeilkopf). Desweiteren traten im Cytoplasma vermehrt Lipidtropfen als auch Lipidtropfenansammlungen auf (Abb. 4.77).

Abb. 4.74: Verdünnung 1:2, 1 d x 10200; Abb. 4.75: Verdünnung 1:2, 1 d x 13800; Abb. 4.76: Verdünnung 1:4, 2 d x 9450; Abb. 4.77: Verdünnung 1:4, 2 d x 28000.

Abb. 4.78 - 81. *Sedimentextrakt aus der Körsch.* Neben einer zunehmend unregelmäßigen Zellform (Abb. 4.78) konnten öfter Zelkerne mit veränderter Gestalt sowie einer starken Marginalisierung des Heterochromatin beobachtet werde (Abb. 4.79). In einigen Zellen waren die Dictyosomen eng mit myelinartigen Strukturen assoziiert (Abb. 4.80) oder ihre Zisternen waren deutlich dilatiert (Abb. 4.81).

Abb. 4.78: Verdünnung 1:2, 1 d x 6900; Abb. 4.79: Verdünnung 1:2, 2 d x 8600; Abb. 4.80: Verdünnung 1:2, 2 d x 20800; Abb. 4.81: Verdünnung 1:2, 2 d x 21600.

Abb. 4.82 - 84. *Sedimentextrakt aus der Körsch.* Die mit acetonischen Sedimentextrakt aus der Körsch belasteten Zellen wiesen nach 2 d eine deutliche Zunahme des SER-Gehaltes auf (Abb. 4.82). Im Cytoplasma traten zahlreiche Vakuolen (Abb. 4.83) sowie große Lysosomen auf (Abb. 4.83). Selten konnten Kristalle in dilatierten Zisternen des RER beobachtet werden (Abb. 4.84).

Abb. 4.82: Verdünnung 1:2, 2 d x 12700; Abb. 4.83: Verdünnung 1:2, 2 d x 18900; Abb. 4.84: Verdünnung 1:2, 2 d x 27000.

Häufig zeigten die körschbelasteten Primärhepatocyten veränderte Zell- und Kernformen sowie eine Verlagerung der Zellkerne in die Peripherie. Das Cytoskelett wird aus Mikrotubuli, Mikrofilamenten, Myosin- und Intermediärfilamenten aufgebaut und ist von Bedeutung bei intrazellulären Transport, Bewegung, Cytokinese, cytoplasmatischer Struktur und Erhaltung der morphologischen Gestalt. Die angeführten zellulären Veränderungen in den belasteten isolierten Hepatocyten könnten auf Schädigungen des Cytoskeletts zurückzuführen sein. Denn Untersuchungen an gereinigtem Tubulin aus Rattenhirn zeigten, daß organische Trialkyl- und Triarylverbindungen *in vitro* die Tubulinpolymerisation inhibieren (Tan et al., 1978).

Ein wichtiger Angriffsort der Krähenbach und Körsch Sedimentextrakte war eindeutig der Zellkern (vgl. Kapitel 6). Neben einer Zunahme und Marginalisierung des Heterochromatins, einer Dilatation der Kernhülle waren häufiger Zellkerne mit deformierter Kernform zu beobachten. Die Zunahme an Heterochromatin könnte im Zusammenhang stehen mit einer Inaktivierung bzw. Veränderung der metabolischen Aktivität des Zellkernes. Die Derformation der Kerngestalt könnte als Versuch gewertet werden, die Oberfläche zwischen Nucleo- und Cytoplasma zu vergrößern und somit einen Austausch intrazellulären Materials zwischen den beiden Zellkompartimenten zu erleichtern (Zahn & Braunbeck, 1995). Eine vergleichbare Dilatation der Kernhülle, wie in der vorliegenden Untersuchung, konnte auch in einer *In vivo* Studie mit jungen Hähnen nach Belastung mit Cadmiumchlorid und einem Organophosphorinsektizid in den Hepatocyten beobachtet werden (Chishti & Rotkiewicz, 1993). Interessanterweise konnte das Schwermetall Cadmium über die gesamte Probennahmenzeit kontinuierlich im Sediment beider Fließgewässer nachgewiesen werden (Honnen et al., 1999b). Das Auftreten von Einschlüssen im Kern von Körsch Sedimentextrakt belasteten isolierten Hepatocyten ist zum Teil auf die starke Deformierung der Kernhülle zurückzuführen, so daß einige beobachtete Einschlüsse als Pseudoeinschlüsse zu werten sind.

Effekte an den Mitochondrien wie eine erhöhte Heterogenität in Größe und Form als auch Veränderungen an den Cristae bewirken eine vergrößerten Austauschoberfläche und könnten in Wechselbeziehung stehen mit adaptiven Modifikationen mitochondrialer Stoffwechselwege (Braunbeck & Völkl, 1991). Enge Assoziationen von Mitochondrien mit RER-Zisternen und Peroxisomen sowie eine erhöhte Heterogenität in Größe und Form der Mitochondrien waren auch in isolierten Hepatocyten der Regenbogenforelle nach Belastung mit Deponiesickerwasser zu beobachten (Zahn et al., 1995). Weiterhin zeigten Microinjektionsversuche an juvenilen Regenbogenforellen nach Belastung mit PCB kontaminierten Sedimentextrakten hypertrophische Mitochondrien sowie eine starke Vesikulierung des RER in den Hepatocyten auf (Engwall et al., 1994). Eine starke Vesikulierung sowie Dilatation der RER-Zisternen waren auch in isolierten Hepatocyten nach Belastung mit Sedimentextrakten aus dem Krähenbach und der Körsch festzustellen (Strmac & Braunbeck, 1997a). Zahn et al. (1995) konnten nach Belastung mit Deponiesickerwasser ebenfalls eine Dilatation der RER-Zisternen beobachten. Für die Dilatation der RER-Zisternen könnte eine erhöhte Syntheseaktivität, die in einer erhöhten Speicherung metabolischer Produkte in den RER-Zisternen resultiert, verantwortlich sein (Ghadially, 1988).

Das Auftreten einzelner Proteinkristalle in dilatierten RER-Zisternen als Anzeichen nicht sezernierter Proteine ist ein weiterer Beleg für schadstoffinduzierte Störungen der Proteinsynthese in isolierten Hepatocyten nach Belastung mit acetonischem Sedimentextrakt der Körsch. Ein vergleichbares Auftreten von Proteinkristallen in dilatierten RER-Zisternen zeigten auch isolierte Hepatocyten der Regenbogenforelle nach Belastung mit Atrazin und Malachitgrün (Zahn, 1995, Zahn & Braunbeck, 1995).